



## MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



REC'D 18 OCT 2000

WIPO

PCT

10/048013D.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....

N. FI99 A 000171

EP 00 / 07 108

4

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

26 SET. 2000

Roma, li .....

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Ing. Giorgio ROMANI



DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE(I)

1) Denominazione **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE**Residenza **FIRENZE**codice **0.1279.680480**

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.C.B.

cognome nome **Livio Brighenti**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

**NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.**via **Lungarno Amerigo Vespucci**n. **24**

città

**Firenze**cap **50123**

(prov)

**FI**

C. DOMICILIO ELETTIVO DESTINATARIO

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/scl)

gruppo/sottogruppo

**Processo per incrementare la motilità degli spermatozoi e spermatozoi a motilità superiore così ottenuti.**ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

1) **LUCONI Michaela**3) **FORTI Gianni**

cognome nome

2) **BALDI Elisabetta**

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) ☐2) ☐

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

**NESSUNA**

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **10**Doc. 2) **2** **PROV** n. tav. **06**Doc. 3) **0** **RIS**Doc. 4) **0** **RIS**Doc. 5) **0** **RIS**Doc. 6) **0** **RIS**Doc. 7) **0**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale lire **trecentosessantacinquemila=**

obbligatorio

9) marche da bollo per attestato di brevetto di lire **---**

obbligatorio

COMPILATO IL **26/07/1999**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

**NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.**CONTINUA SI/NO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI **FIRENZE**codice **48**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**FI99A000171**

Reg.A

L'anno milenovecento

**novantanove**

il giorno

**ventisei**

del mese di

**luglio**il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **0** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

**nessuna**

IL DEPOSITANTE

**Clignon Mirallegre**timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

**WZ**

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

FI99A000171

REG. A

DATA DI DEPOSITO

26/07/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Residenza

FIRENZE

## D. TITOLO

Processo per incrementare la motilità degli spermatozoi e spermatozoi a motilità superiore così ottenuti.

Classe proposta (sez./cl./scl/)

(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

Sono descritti un processo che consente di aumentare la motilità degli spermatozoi inibendo l'enzima fosfatidilinositol-3 kinasi (PI3K) e gli spermatozoi così ottenuti.

## M. DISEGNO

UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
FIRENZE

Registrazione brevetti

Il Funzionario



000171

26 LUG 99

Descrizione della Domanda di Brevetto di Invenzione dal titolo: FIRENZE/A INVENZIONE

Processo per incrementare la motilità degli spermatozoi e spermatozoi

a motilità superiore così ottenuti.

A nome di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

con sede in: FIRENZE (FI)

Inventori designati: Michaela LUCONI, Elisabetta BALDI, Gianni FORTI.

Depositata il \_\_\_\_\_ con il n° \_\_\_\_\_

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce ad un processo che consente di aumentare la motilità degli spermatozoi per inibizione dell'enzima fosfatidilinositol-3 kinasi (PI3K) e agli spermatozoi ottenuti con detto processo.

Stato dell'arte

L'infertilità di coppia, definita come incapacità della coppia ad ottenere un concepimento dopo almeno un anno di rapporti sessuali regolari non protetti, è un problema multifattoriale, in cui il fattore maschile gioca un ruolo fondamentale in circa il 40-50% dei casi. La ridotta fertilità maschile è in genere legata ad alterazioni dei parametri seminali quali morfologia, motilità e numero degli spermatozoi.

Le diverse tecniche di fecondazione assistita si propongono come trattamento della sterilità di coppia permettendo in molti casi di superare sia il problema del fattore maschile che quello femminile.

Queste metodiche, la cui scelta dipende dal tipo di diagnosi effettuate, prevedono il prelievo dei gameti maschili e femminili che poi vengono

UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
FIRENZE  
Ufficio Verde  
Al Funzionario



trasferiti direttamente nelle tube (GIFT=Trasferimento Intratubarico dei Gameti) oppure vengono messi in contatto in vitro e quindi l'embrione che si forma viene trasferito nell'utero (FIVET=Fertilizzazione In Vitro e Trasferimento degli Embrioni). Nei casi più gravi di infertilità maschile, in cui il numero di spermatozoi o la motilità di questi è molto

---

bassa, si può ricorrere a tecniche di fecondazione microassistita, di cui la più usata e che presenta una maggior percentuale di successo è l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI). Nel caso di fattore maschile, discriminanti per la scelta della metodica di fecondazione assistita sono alcuni parametri del liquido seminale ed in particolare il numero e la motilità degli spermatozoi.

Per l'applicazione delle tecniche suddette è evidente l'importanza di poter intervenire sulla motilità degli spermatozoi in modo da poter disporre di un numero maggiore di spermatozoi attivi ed eventualmente eliminare il ricorso alla ICSI che è una tecnica invasiva e supera le naturali barriere che gli spermatozoi devono superare per fecondare l'oocita e che costituiscono un naturale meccanismo di selezione degli spermatozoi.

Vari metodi sono stati studiati per aumentare la motilità degli spermatozoi (ad esempio: trattamento con pentossifillina, platelet-activating factor e progesterone), ma i risultati ottenuti sono variabili e la responsività degli spermatozoi non è prevedibile e dipende dai singoli pazienti.

Descrizione delle figure

Fig. 1 Effetti dell'incubazione del liquido seminale con LY294002 10

$\mu\text{M}$  sulla motilità degli spermatozoi. A: effetti sulla componente progressiva rapida (a) nei singoli pazienti. B: effetti sulla motilità progressiva rapida (a) e rapida + lenta (a+b) degli spermatozoi; valori medi  $\pm$  SEM. Sono indicate le significatività rispetto ai valori di controllo (CONTROL).

Fig. 2 Effetti dell'incubazione del liquido seminale con LY294002 100  $\mu\text{M}$  sulla motilità progressiva degli spermatozoi ricavati nella fase di recupero del swim up.

Fig. 3 Effetti dell'LY294002 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  sulla motilità progressiva degli spermatozoi ricavati mediante swim up nei singoli pazienti.

Fig. 4 Effetti dell'incubazione di spermatozoi ricavati mediante swim up con LY294002 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  sulla motilità progressiva; valori medi  $\pm$  SEM; Sono indicate le significatività e le percentuali di incremento rispetto ai valori di controllo (C). Insetto: effetti dell'incubazione per 2 ore degli spermatozoi selezionati mediante swim up con LY294002 100  $\mu\text{M}$  sulla vitalità.

Fig.5 Effetti dell'incubazione di spermatozoi ricavati mediante swim up con LY294002 10  $\mu\text{M}$  sulla motilità progressiva. A: effetti sulla componente progressiva rapida (motilità a) nei singoli pazienti. B: effetti sulla motilità progressiva (a e a+b) degli spermatozoi; valori medi  $\pm$  SEM. Sono indicate le significatività rispetto ai valori di controllo (CONTROL).

Fig.6 Effetti di concentrazioni crescenti di LY294002 ( $\mu\text{M}$ ) sulla motilità progressiva degli spermatozoi selezionati mediante swim up. Valori medi  $\pm$  SEM. Sono indicate le significatività rispetto ai valori di

controllo (0).

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione consente di aumentare significativamente la percentuale di spermatozoi con motilità progressiva in soggetti maschi infertili con ridotto numero e/o motilità degli spermatozoi grazie ad un

---

processo che prevede il trattamento degli spermatozoi con un inibitore dell'enzima fosfatidilinositol-3 kinasi (PI3K).

L'enzima PI3K, già descritto in altri tipi cellulari somatici (Vanhaesebroeck et al., 1997) è un enzima eterodimerico presente in varie isoforme e composto da una subunità catalitica di 110 kDa che si associa ad una subunità regolatrice di 85 kDa ed è presente ed attivo negli spermatozoi umani.

Il processo secondo l'invenzione può essere applicato agli spermatozoi direttamente nel liquido seminale o durante la separazione mediante swim up, mediante separazione su gradienti di percoll o mediante altre tecniche di arricchimento degli spermatozoi usate in metodiche di riproduzione assistita in soggetti maschi normozoospermici e oligozoospermici.

L'inibitore viene aggiunto al liquido seminale contenuto in una provetta oppure al medium contenente gli spermatozoi separati mediante swim up, gradienti di percoll o altre tecniche. La motilità è quindi valutata negli spermatozoi del liquido seminale, o della frazione separata mediante swim up od altre tecniche dal liquido seminale, a cui è stato aggiunto l'inibitore. In alternativa, la motilità è valutata negli spermatozoi separati mediante swim up od altre tecniche a cui è stato



aggiunto l'inibitore.

Ad esempio, il swim up viene eseguito mediante stratificazione in provetta di 1 ml di medium contenente albumina su un 1 ml di liquido seminale sottostante. Dopo un'ora di incubazione a 37°C all'aria o al 5% di CO<sub>2</sub>, viene raccolta la fase superiore di medium in cui sono

---

migrati gli spermatozoi con caratteristiche di motilità migliori. Tali spermatozoi vengono utilizzati per le tecniche di riproduzione assistita.

Gli spermatozoi comunque venuti in contatto con LY294002 nel liquido seminale o nel swim up vengono poi lavati da questa sostanza nei vari passaggi tecnici che costituiscono i diversi protocolli di preparazione del gamete maschile nelle varie tecniche di fecondazione assistita. La sostanza non verrebbe quindi mai direttamente in contatto con la paziente a cui vengono trasferiti in utero gli eventuali ovuli fecondati (ICSI e FIVET) o nelle cui tube vengono inseriti i gameti maschili (GIFT).

Fra gli inibitori dell'enzima, già noti in letteratura, utili per l'invenzione si possono ricordare, ad esempio, la Wortmannin e il 2-(4-morfolin)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-one (indicato normalmente con la sigla LY294002).

Il processo secondo la presente invenzione è applicabile non solo agli spermatozoi umani ma anche a quelli di altri mammiferi quando sia necessario aumentarne la mobilità purché, ovviamente, detti spermatozoi contengano l'enzima PI3K.

Le quantità utilizzate sono quelle descritte come attive in altri tipi

cellulari e sono normalmente comprese fra 0.01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ .

I tempi di trattamento sono normalmente compresi fra 2 e 6 ore a 37 °C e 5% di  $\text{CO}_2$ .

Nel processo secondo l'invenzione si è rivelato particolarmente efficace

---

l'LY2940002.

L'invenzione viene ora meglio illustrata alla luce dall'esempio qui di seguito riportato.

#### Esempio

L'inibitore è stato aggiunto in concentrazione 10  $\mu\text{M}$  al swim up ottenuto dal liquido seminale di un paziente ed incubato per 2 ore a 37°C e 5% di  $\text{CO}_2$ . E' stata quindi valutata al microscopio la motilità degli spermatozoi così trattati.

Altre misure sono state eseguite utilizzando, al posto del preparato swim up tal quale, il liquido seminale cui era stato aggiunto l'inibitore secondo le modalità descritte nell'esempio sopra riportato o lo swim up derivato dal liquido seminale così trattato.

I risultati sono riassunti nelle figure allegate e sono qui di seguito commentati.

La somministrazione di inibitori dell'enzima PI3K determina un significativo incremento della motilità progressiva rapida + lenta (a+b) degli spermatozoi ed in particolare della motilità progressiva rapida (a).

L'aggiunta dell'inibitore della PI3K direttamente al liquido seminale sottoposto quindi a swim-up, determina un incremento della motilità

progressiva (a+b) sia degli spermatozoi nel liquido seminale (Fig. 1A,B) sia di quelli recuperati nella fase superiore (Fig. 2), utilizzabili poi per le tecniche di IVF.

L'aggiunta dell'inibitore della PI3K agli spermatozoi separati mediante swim up determina un incremento della motilità progressiva (a+b) ed in particolare della componente rapida (a), (Fig. 3,4,5).

L'incremento della motilità risulta dipendente dalla dose di inibitore utilizzato ed è descritto da una curva dose-risposta ad andamento sigmoidale (Fig. 6) con una dose efficace 50 ( $EC_{50}$ ) di  $1.0 \pm 0.5 \mu M$ . Tale incremento risulta anche dipendente dalla durata del tempo di incubazione del campione con l'inibitore, in quanto è già significativo a 30 minuti di incubazione e raggiunge un massimo a circa 2 ore, mantenendosi nel tempo anche a 24 ore.

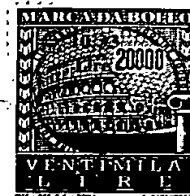
La somministrazione di LY294002 al swim up determina un significativo aumento della motilità iperattivata del campione, parametro valutato con il sistema computerizzato CASA ed indice dello stato di capacitazione degli spermatozoi, processo quest'ultimo fondamentale per la fertilizzazione.

L'incubazione prolungata con LY294002 anche a dosi elevate ( $100 \mu M$ ) non altera la vitalità delle cellule (valutata con test eosina e hypoosmotic swelling a 2 ore e 24 ore di incubazione), Fig. 4, inserto.

Gli effetti di stimolazione della motilità progressiva sono tanto più evidenti quanto più grave è la patologia spermatica dei pazienti (oligospermia, astenospermia, teratospermia), ma sono presenti anche in soggetti normospermici.

## RIVENDICAZIONI

1. Processo per incrementare la motilità degli spermatozoi in cui si trattano gli spermatozoi con un inibitore dell'enzima fosfatidilinositol-3 kinasi (PI3K).
2. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il processo è realizzato sul liquido seminale contenente gli spermatozoi.
3. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il processo è realizzato su spermatozoi separati mediante swim up, su gradienti di percoll o mediante altre tecniche di separazione degli spermatozoi usate in tecniche di riproduzione assistita.
4. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui il processo è realizzato su spermatozoi umani e di altri mammiferi.
5. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'inibitore dell'enzima PI3K è la Wortmannin.
6. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'inibitore dell'enzima PI3K è il 2-(4-morfolin)-8-fenil-4H-1-benzopiran-4-one (LY294002).
7. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui l'inibitore viene aggiunto al liquido seminale contenuto in una provetta, oppure al medium contenente gli spermatozoi separati mediante swim up, gradienti di percoll o altre tecniche, in quantità compresa tra 0,01 - 100  $\mu$ M e il liquido così trattato è incubato a 37°C per 2 - 6 ore.
8. Spermatozoi in cui l'attività dell'enzima fosfatidilinositol-3 kinasi è inibita.
9. Spermatozoi secondo la rivendicazione 8 ottenuti secondo il processo secondo la rivendicazione 1.



Firenze,

26 LUG. 1999

p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Il Mandatario

*Livio Brighenti*

Dr. Livio Brighenti

della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA



UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
FIRENZE  
Ufficio Brevetti  
Il Funzionario

*Ue*

000171 26 LUG 99

FIRENZE PATENT

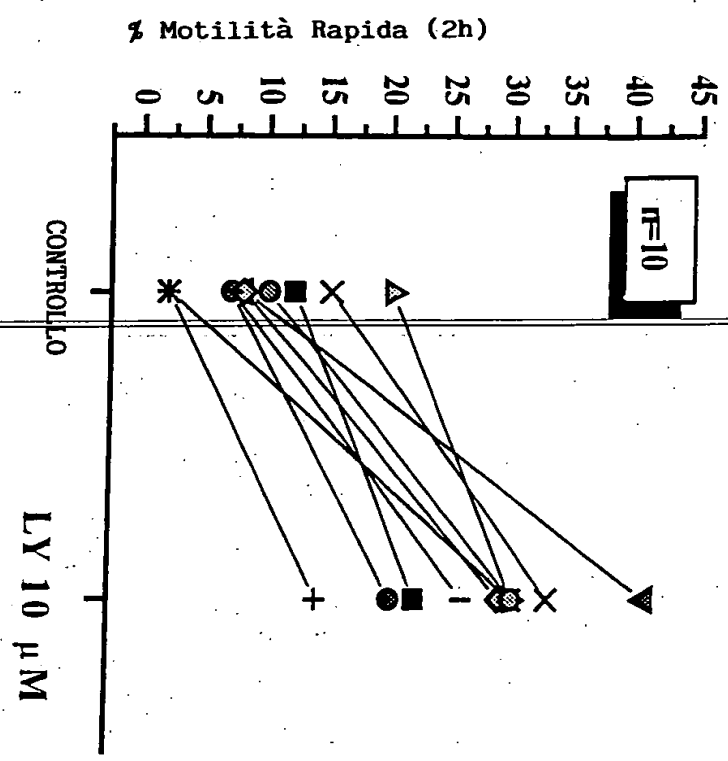
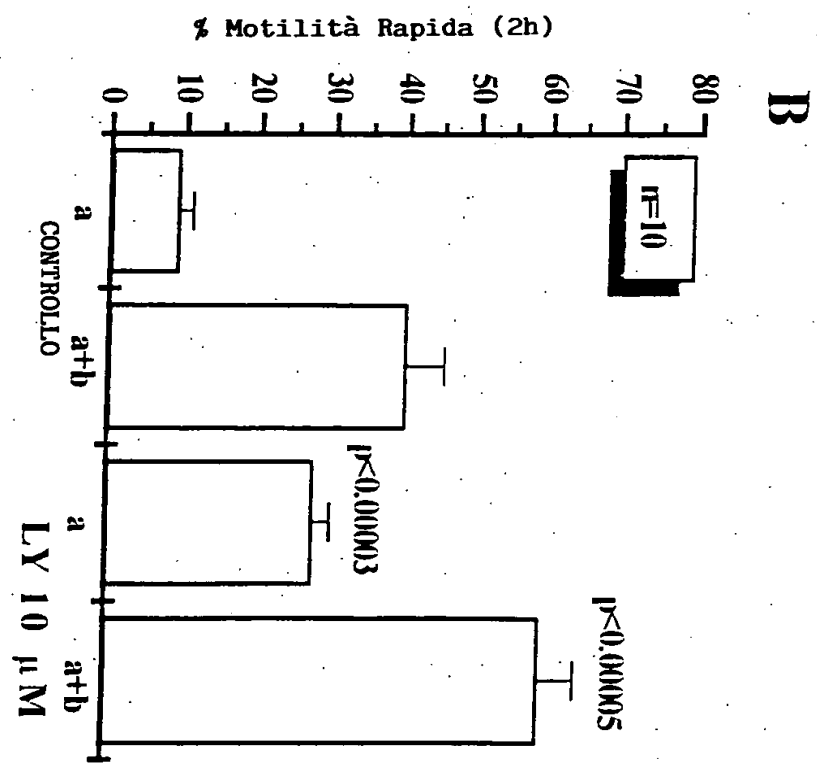


FIG. 1



UFFICIO REGIONALE DELL'INDUSTRIA  
 DEL COMMERCE E DELL'INNOVAZIONE  
 FIRENZE  
 Ufficio Brevetti  
 Il Funzionario

*Uel*

Risso Bignardi

NOTARBARTOLO & GERVASI spa

% Motilità Progressiva (2h)

10 20 30 40 50 60 70 80

000171 26 LUG 99

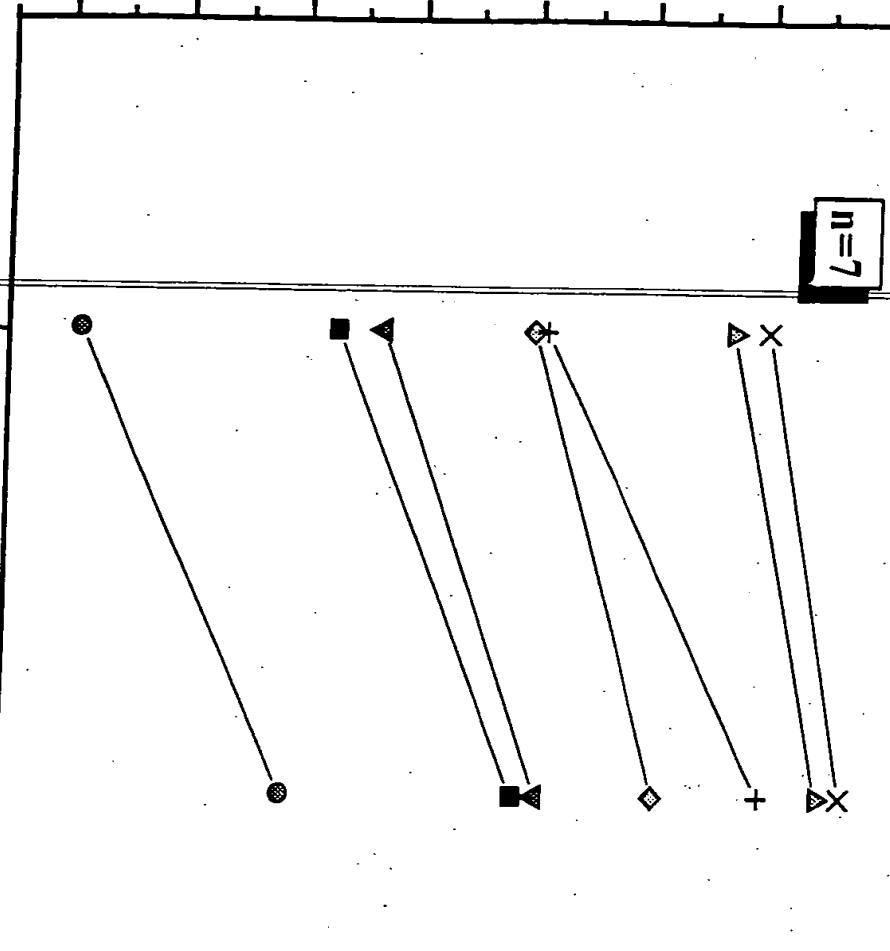
FIRENZE/INVENZIONI

n=7

CONTROLLO

LY 100  $\mu$ M

FIG. 2



MINISTERO DELL'INDUSTRIA  
DEL COMMERCIO E DELL'ENERGIA  
FIRENZE  
Ufficio Brevetti  
Il Funzionario

leg

Livio Briganti

ARBARTOLO & GERVASI spa

% Motilità Progressiva (2h)

000171

26 LUG 99

FIRENZE/AR

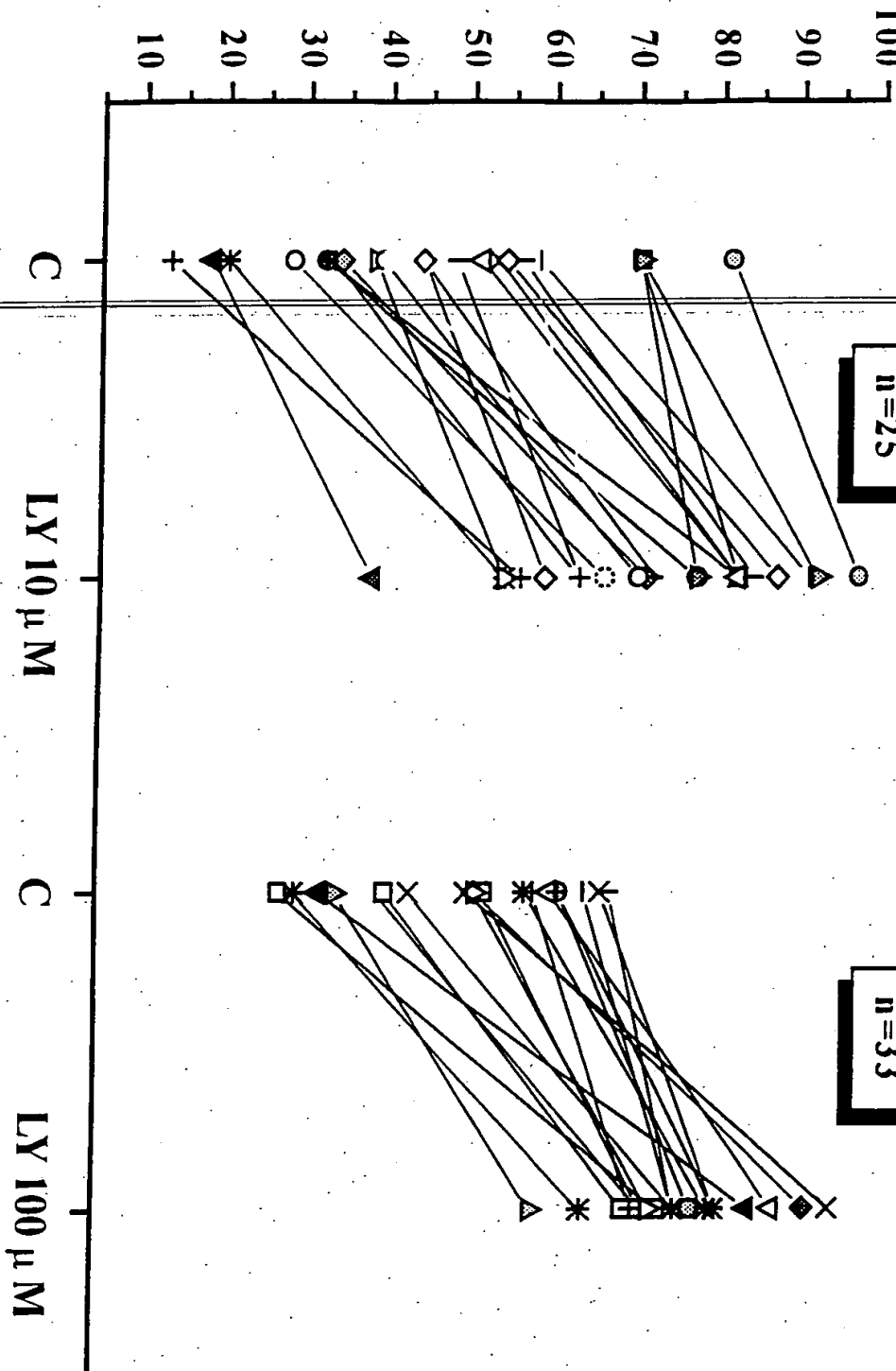


FIG.3



UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
FIRENZE  
Ufficio Brevetti  
Il Funzionario

000171 26 LUG 99

FIRENZE/INVENZIONE

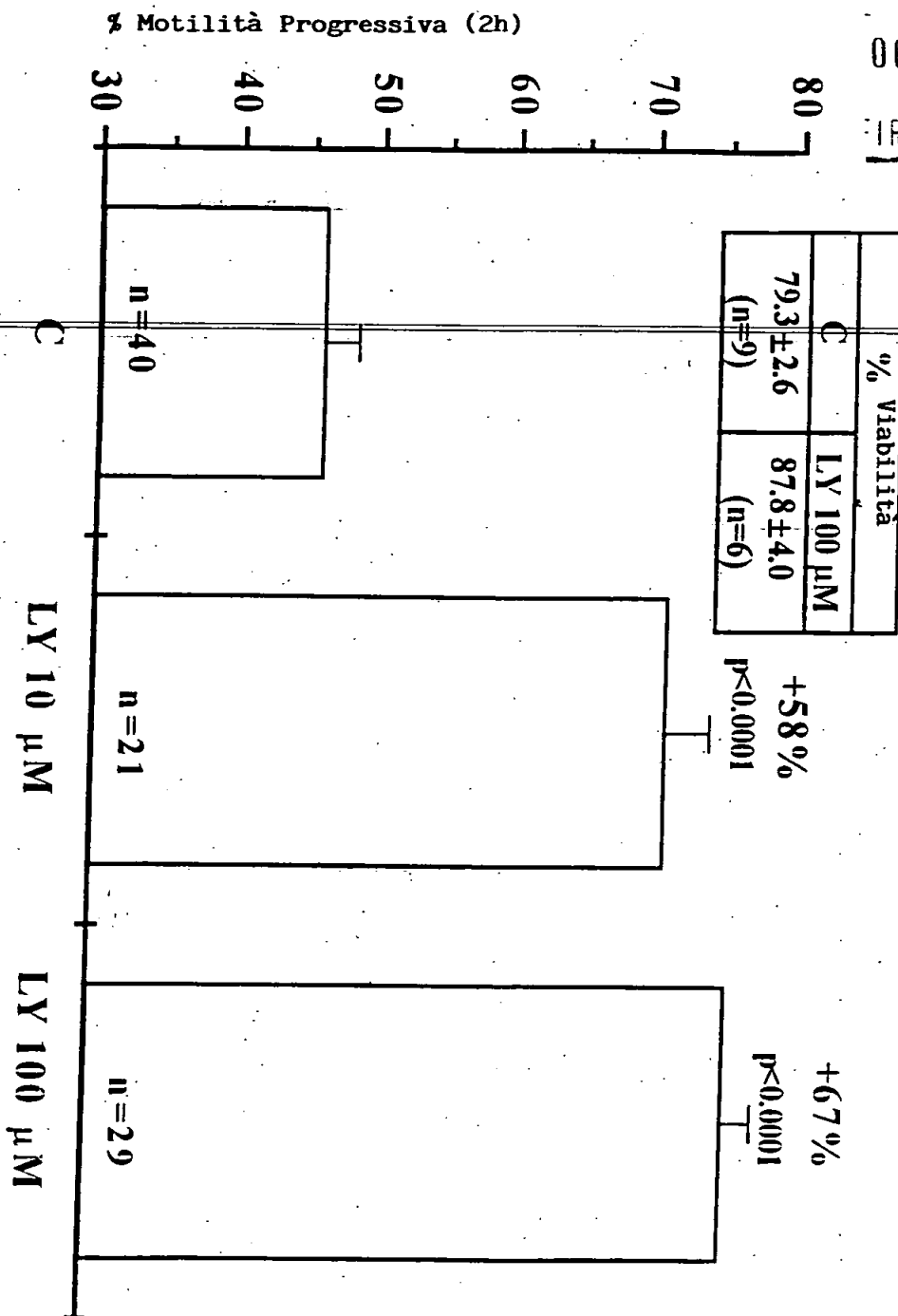


FIG. 4



UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
 DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
 FIRENZE  
 Ufficio Brevetti  
 Il Funzionario

*lu*

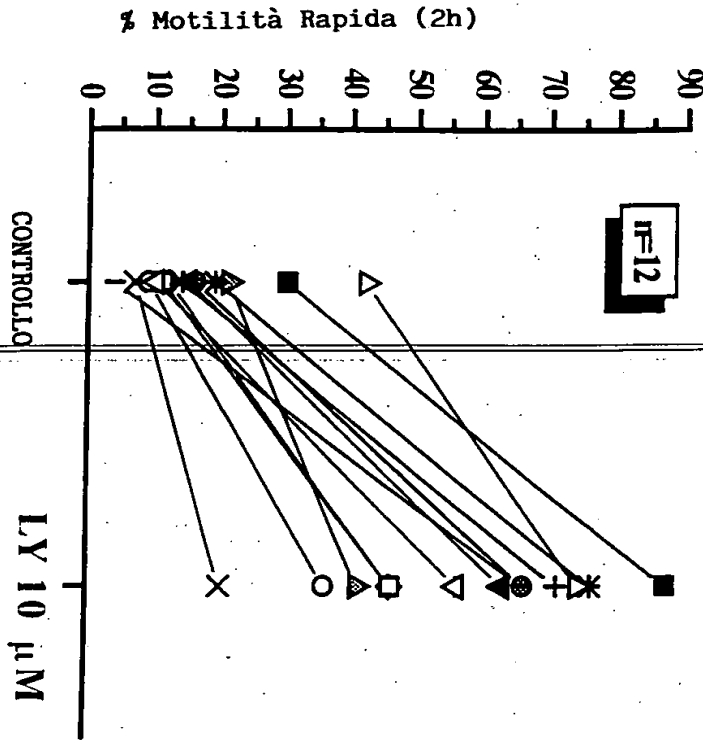
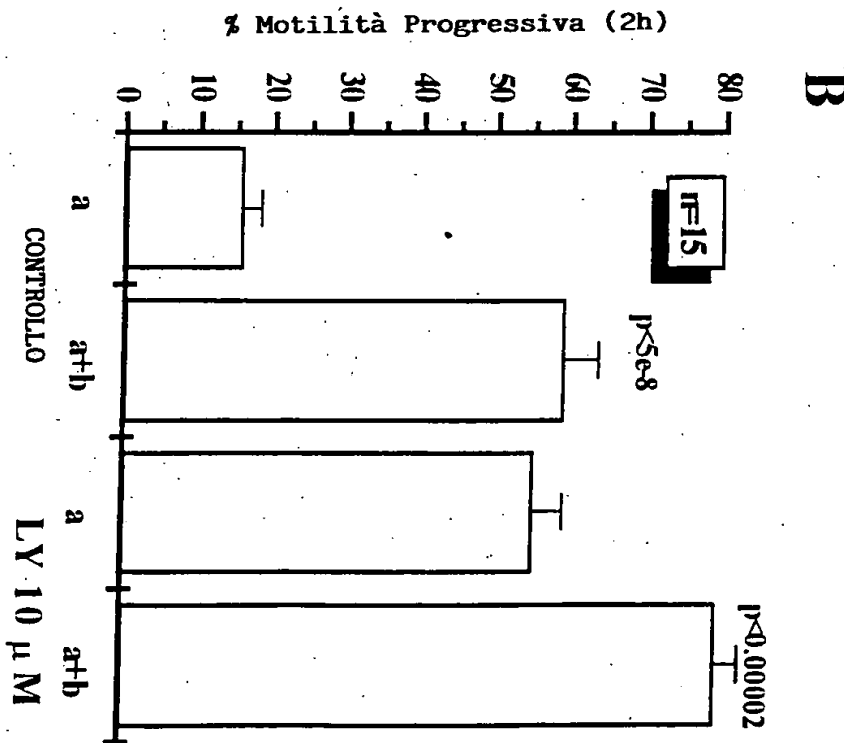


FIG. 5



000171 26 LUG 99

FIRENZE/INVENZIONI

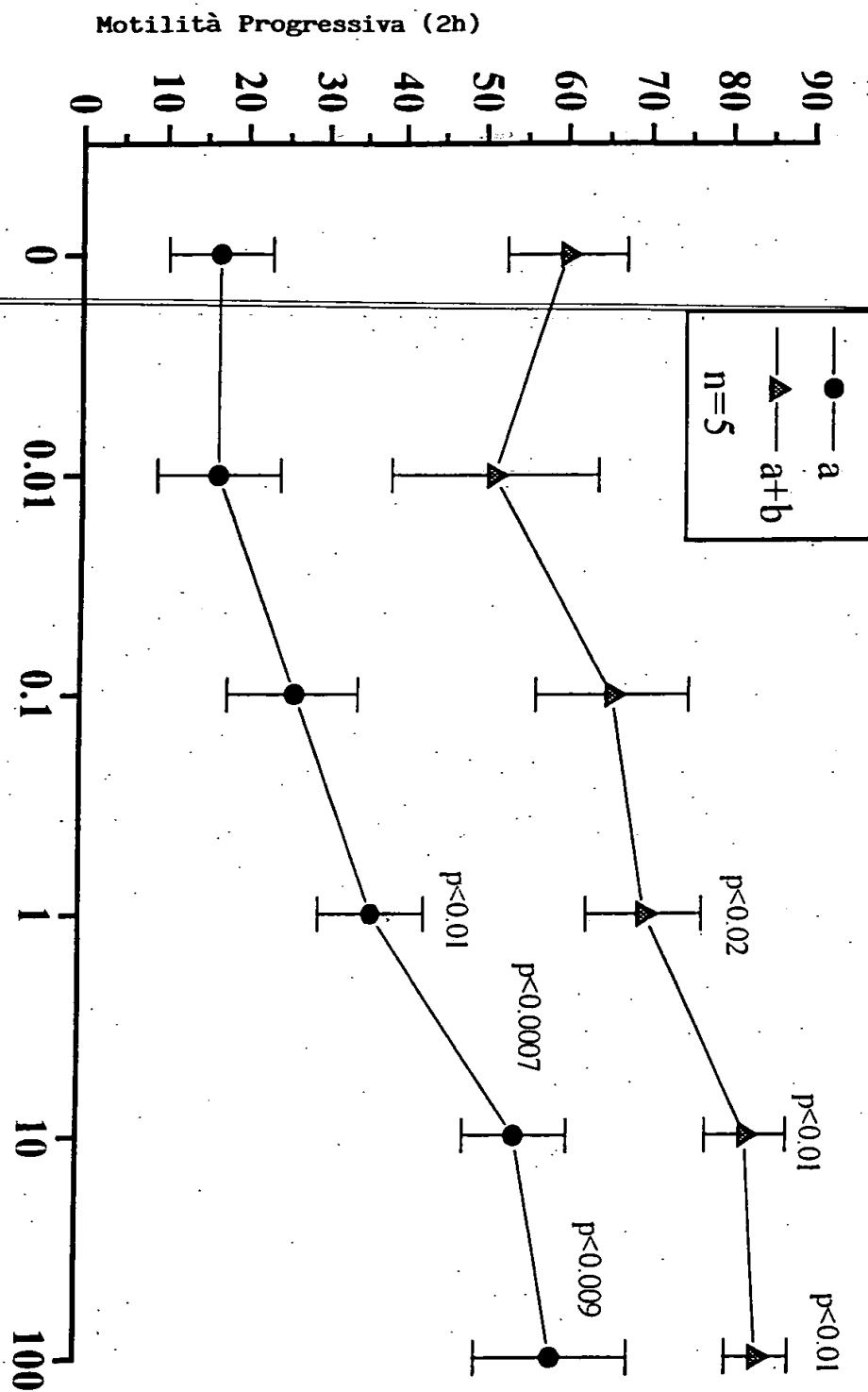


FIG. 6



UFFICIO PROVINCIALE DELL'INDUSTRIA  
 DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
 FIRENZE  
 Ufficio Brevetti  
 Il Funzionario